VISIT…

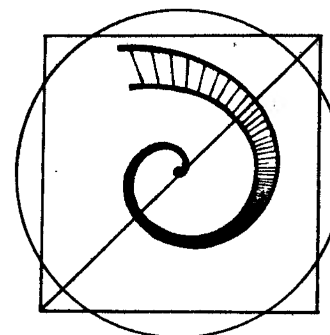
LANZAROTE
Caliente.COM

А К А Д Е М И Я   Н А У К   С С С Р
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Институт цитологии и генетики
ВСЕСОЮЗНОЕ БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
Новосибирское отделение

оперативно-информационный материал

МЕТОДИКИ

ДЛЯ РАБОТ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



НОВОСИБИРСК 1986

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий материал издается по инициативе комплексного творческого молодежного коллектива (КТМК) и написан в основном его членами. Необходимость написания такого материала связана с очень быстрым развитием методов молекулярной генетики и генетической инженерии и внедрением их во многие отрасли биологической науки. Всего лишь несколько лет назад эти методы были достоянием только двух лабораторий нашего Института, а сейчас их осваивают или уже активно используют в десяти основных лабораториях или группах. Молекулярно-генетические методы довольно трудоемки и, чтобы ими овладеть, требуются, как правило, значительные усилия и время. В то же время у нас ощущается острая нехватка методической литературы по генетической инженерии, и даже недавнее издание на русском языке замечательной книги Т.Маниатиса, Е.Фрича и Дж.Сэмбрука "Молекулярное клонирование" полностью этой проблемы не решило.

Предлагаемый материал был задуман как собрание кратких лаконично написаных методичек. В подборку публикуемого материала мы стремились включить, прежде всего, наиболее широко используемые методики, которые за последние годы были модифицированы; методики, освоение которых связано с определенными трудностями; а также методики, современное описание которых отсутствует в доступных изданиях на русском языке.

Для написания данного материала были привлечены квалифицированные сотрудники, имеющие опыт работы с рекомбинантными ДНК. Поэтому многие, если не большинство разделов, содержат усовершенствования или элементы оригинальных авторских разработок.

От имени всех авторов мы благодарим член-корреспондента АН СССР Р.И.Салганика и других сотрудников Института цитологии и генетики СО АН СССР, поддержавших издание этого материала и оказавших помощь в его составлении и опубликовании.

Мы будем признательны за все замечания и пожелания по содержанию и оформлению этого материала.

А.В.Мазин
К.Д.Кузнеделов

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ

I. Выделение ДНК фага λ I
(Блинов А.Г.)

П. Метод быстрого выделения плазмидной ДНК 4
(Холодилов Н.Г.)

Ш. Выделение плазмидной ДНК центрифугированием в двухступенчатом градиенте хлористого цезия
(Кузьминов А.В.)

А. Выращивание бактерий и амплификация плазмидной ДНК 6

Б. Получение осветленного лизата 6

В. Приготовление градиента CsCl и центрифугирование 7

ГИДРОЛИЗ ДНК ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ 9
(Боровков А.Ю.)

ВВЕДЕНИЕ МЕТКИ В ДНК

I. Введение концевой метки в ДНК I4
(Мазин А.В.)

А. Введение метки в ДНК с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 .... I4

Б. Введение концевой метки в ДНК с помощью фрагмента Кленова I6

П. Ник-трансляция I8
(Протопопов М.О.)

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК 20
(Боровков А.Ю.)

А. Электрофорез в агарозных гелях 20

Б. Электрофорез в акриламидных гелях 22

ТРАНСФОРМАЦИЯ E.coli MH-1 ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРИСТОГО МАРГАНЦА 27
(Наякшин А.М.)

ДЕТЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ 30
(Кузнеделов К.Д.)

А. Перенос на фильтры небольшого количества бактериальных колоний 3I

Б. Перенос на фильтры большого количества бактериальных колоний 32

В. Перенос на фильтры бляшек бактериофага λ 33

Г. Амплификация бактериофага λ in situ ... 34

Д. Подготовка фильтров для гибридизации ... 35

Е. Гибридизация ДНК, иммобилизованной на фильтрах,с меченными зондами 36

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

I. Метод определения первичной структуры ДНК по Максаму-Гилберту 40
(Мазин А.В.)

А. Элюция фрагментов ДНК из геля путем диффузии в буфер 40

Б. Химические реакции расщепления ДНК 41

II. Определение первичной структуры ДНК методом Максама-Гилберта с использованием ацетонового осаждения (Холодилов Н.Г.) 45

А. Электроэлюция ДНК из полиакриламидного геля 45

Б. Химические реакции расщепления ДНК 46

III. Метод определения нуклеотидной последовательности ДНК по Максаму-Гилберту на твердой фазе (Федоров С.П.) 48

А. Электроэлюция ДНК из геля на DEAE-целлюлозу 48

Б. Химические реакции расщепления ДНК 48

ПРИЛОЖЕНИЕ 52

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 60

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ

I. Выделение ДНК фага λ

1. Фаговую бляшку размером 3–4 мм вырежьте из агара и суспендируйте в 500 мкл SM буфера.

   SM буфер:

   - I00 мМ NaCl
   - I0 мМ $MgSO_4$ ($MgCl_2$)
   - 20 мМ трис-HCl, pH 7.5
   - 0.0I% желатин

2. Для высвобождения фаговых частиц из агара фаговую суспензию инкубируйте I час при 37°C.

3. К фаговой суспензии добавьте 20–50 мкл ночной культуры E.coli (D_{550} = I–I,5 о.е.) и инкубируйте I0–I5 мин для адсорбции фага на клетках. Для наработки фагов используйте следующие штаммы E.coli: K-802, DP-50, LE-392 и др.

4. Инфицированные фагом клетки внесите в 200–500 мл среды LB (см. приложение), содержащей I0 мМ $MgSO_4$ ($MgCl_2$) и инкубируйте 8–I2 часов до полного лизиса клеток на качалке при 37°C. Затем добавьте 2–3 мл хлороформа и инкубируйте еще I0–I5 мин в тех же условиях.

5. Клеточный дебрис удалите центрифугированием на центрифуге J2-21 в роторе JA-10, I0 мин, 7 000 об/мин, 4°C. Осадок удалите, к супернатанту добавьте панкреатическую

ДНКазу и РНКазу до конечной концентрации I0 мкг/мл и инкубируйте I час при 37°С (можно использовать отечественные препараты нуклеаз).

6. Добавьте к лизату ПЭГ 6 000 до конечной концентрации I0%, растворите на магнитной мешалке, и NaCl до конечной концентрации I М и оставьте на ночь в холодильнике до образования осадка фаговых частиц. Все указанные выше процедуры проводите в центрифужных стаканах для ротора JA-10 или ротора JA-14 в зависимости от объема фагового лизата.

7. Фаговые частицы соберите центрифугированием, I0 000 об/мин, I0 мин, 4°С. Супернатант удалите, осадок суспендируйте в 3-5 мл SM буфера, затем добавьте равный объем хлороформа и энергично перемешайте в течение 30 сек. Далее центрифугируйте в любом бакет-роторе 5 мин, 3 000 об/мин при комнатной температуре. Соберите водную фазу, содержащую фаговые частицы.

8. Добавьте к фаговой суспензии кристаллический CsCl (на I мл суспензии - 0,5 г CsCl). После растворения хлористого цезия нанесите фаговую суспензию на ступенчатый градиент CsCl приготовленный на SM буфере в нитроцеллюлозных пробирках для ротора SW-28. Градиент состоит из трех ступеней, с плотностью I,7; I,5 и I,45 г/мл. Центрифугируйте 2 часа, 22 000 об/мин при 4°С. Фаговые частицы будут расположены на границе между слоями с плотностями I,45 и I,5 г/мл.

9. С помощью толстой иглы проколите центрифужную пробирку и соберите фаговые частицы.

I0. Удалите хлористый цезий с помощью диализа против I 000-кратного избытка SM буфера. Диализ проводите 3 раза по I часу при комнатной температуре без перемешивания.

II. Перенесите фаговую суспензию в центрифужную пробирку, добавьте ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ, SDS - до 0,5% и протеиназу К до 50 мкг/мл и инкубируйте 30-60 мин при 65-68°С.

I2. Белки фаговой оболочки удалите четырьмя последовательными экстракциями: фенолом, смесью фенола с хлороформом 5:I, смесью фенола с хлороформом I:I, хлороформом. Для экстракции используйте фенол, перегнанный и насыщенный трис-HCl, pH 8,0. Хлороформ используйте с добавлением I/25 части изоамилового спирта.

I3. ДНК фага λ осадите из водной фазы добавлением равного объема изопропанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия, резко переворачивая пробирку до образования осадка ДНК. Осадок ДНК удалите из пробирки пинцетом, промойте в 70% этаноле, подсушите и растворите в соответствующем объеме ТЕ-буфера (I0 мМ трис-HCl, pH 7,8 и I мМ ЭДТА).

В зависимости от степени лизиса клеток, с 200 мл лизата удается получить от I00 до 500 мкг ДНК. При наработке фага λ в аналитических количествах (5-I0 мл фагового лизата) используйте те же процедуры, что и при препаративной наработке, исключая пункты 8, 9, I0.

П. [redacted]

I. I,5 мл ночной культуры перенесите в эппендорфовскую пробирку, центрифугируйте 3 мин, супернатант удалите с помощью водоструйного насоса.

2. К осадку добавьте I00 мкл раствора I и тщательно суспендируйте.

Раствор I

25 мМ трис-HCl (pH-8,0)
50 мМ глюкоза
20 мМ ЭДТА
2 мг/мл лизоцим

Хранить при +4 +8°C

3. Сразу же добавьте 200 мкл раствора 2, осторожно перемешайте, переворачивая пробирку. Суспензия должна просветлеть и стать более вязкой.

Раствор 2

0,2 N NaOH
1% SDS

Хранить при комнатной температуре

4. Добавьте I50 мкл 3 М ацетата натрия (pH 5,0), хорошо перемешайте и центрифугируйте 5 мин.

5. Осадок удалите из пробирки обратным концом спички. К супернатанту добавьте I мл 96%-го этанола и тщательно перемешайте. Выдержите при комнатной температуре 5-I0 мин.

6. Центрифугируйте 3 мин, супернатант удалите, осадок слегка подсушите и растворите в I00 мкл буфера ТЕ.

7. К раствору ДНК добавьте равный объем 5 М раствора хлористого лития, перемешайте и поместите в лед на I5 мин. Центрифугируйте 5 мин.

Примечание. При скрининге большого количества плазмид можно до обработки хлористым литием провести анализирующий электрофорез в I%-ом агарозном геле и обрабатывать только те клоны, которые Вас устраивают.

8. Супернатант перенесите в чистую пробирку и добавьте I мл 96%-го этанола. Выдержите при -20°C 5-I0 мин и центрифугируйте 5 мин.

9. Супернатант удалите, осадок высушите и растворите в I00 мкл ТЕ-буфера. Полученная этим методом плазмидная ДНК пригодна для рестрикционного анализа, гибридизации и определения последовательности нуклеотидов

II. Выделение плазмидной ДНК центрифугированием в двухступенчатом градиенте хлористого цезия

А. Выращивание бактерий и амплификация плазмидной ДНК

I. Бактериальную колонию инокулируйте в I0 мл питательной среды, содержащей соответствующий антибиотик, и, интенсивно встряхивая, инкубируйте ночь при 37°С.

Примечание. Обычно используют среду LB или M9, обогащенную казаминовыми кислотами до 5-I5 г/л (см. приложение).

2. Инокулируйте 0,I мл ночной культуры в 25 мл питательной среды с антибиотиком и инкубируйте на качалке при 37°С, пока D_{600} не достигнет 0,6.

3. Инокулируйте 25 мл культуры в 500 мл питательной среды, нагретой до 37°С и инкубируйте на качалке при 37° до D_{600} = 0,3.

4. Добавьте к бактериальной культуре I мл раствора хлорамфеникола (85 мг/мл в этаноле) до конечной концентрации антибиотика I70 мкг/мл.

Б. Получение осветленного лизата (Clewell, Helinski, 1969)

I. Клетки из одного литра культуры E.coli осадите центрифугированием на J2-21 (ротор JA10) 7 000 об/мин в течение I5 мин.

2. Осадок ресуспендируйте в 50-I00 мл 50 мМ трис-HCl, pH 8,0 и вновь осадите клетки центрифугированием.

3. Осадок культуры ресуспендируйте при 0°С в 6 мл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl, pH 8,0 и 25% сахарозы.

4. К суспензии клеток добавьте I мл раствора лизоцима 2 мг/мл в 250 мМ трис-HCl pH 8,0. Тщательно, но осторожно перемешайте. Инкубируйте при 0°С. Время инкубации для различных штаммов E.coli может варьировать от 2 до I0 мин и его подбирают эмпирически.

5. Добавьте I мл 0,4 М ЭДТА (pH 8,0), осторожно перемешайте и инкубируйте при 0°С I мин.

6. Суспензию обработанных лизоцимом клеток прилейте тонкой струей при непрерывном перемешивании к 8 мл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl pH 8,0, 5 мМ ЭДТА и 2% тритона X-I00 при 0°С. Полученный лизат сразу же центрифугируйте на J2-21 ротор JA-20 при 4°С I8 000 об/мин в течение часа.

В. Приготовление градиента CsCl и центрифугирование

I. Добавьте в осветленный лизат водный раствор бромистого этидия (I0 мг/мл) до концентрации 700 мкг на мл осветленного лизата. Растворяйте в осветленном лизате кристаллический хлористый цезий до тех пор, пока его коэффициент преломления не достигнет I.38. (Для этого на каждый миллилитр осветленного лизата требуется 0,59 г CsCl.

2. Приготовьте раствор CsCl в дистиллированной воде с коэффициентом преломления I.4I (на I мл H_2O требуется I,58 г CsCl).

3. Ультрацентрифужные пробирки заполните наполовину раствором CsCl с коэффициентом преломления I.4I. Сверху наслоите равный объем осветленного лизата (коэффициент преломления I.38). Пробирки уравновесьте попарно добав-

лением раствора CsCl (η = I,4I), заполните до верху, если необходимо, вазелиновым маслом и запакуйте.

4. Центрифугируйте 24 часа, 45 000 об/мин, ротор Ti 60, Ti 75, 20°C.

5. В результате центрифугирования должны появиться две малиново-красные зоны. Нижняя содержит плазмидную суперспирализованную ДНК. Эту зону откачайте через длинную иглу или стеклянный капилляр с помощью перистальтического насоса.

6. Отобранную фракцию экстрагируйте 4 раза равным объемом бутанола, избавляясь от бромистого этидия, затем разбавьте в 3 раза H_2O и осадите ДНК двумя объемами этанола.

Плазмидная ДНК, выделенная в двухступенчатом преформированном градиенте CsCl, в отличие от полученной обычным центрифугированием не содержит, как правило, заметных примесей РНК и не нуждается в дополнительной хроматографической очистке.

ГИДРОЛИЗ ДНК ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ

Расчет количества фермента

Обычно активность ферментов выражается в относительных единицах, где за I ед. принято количество фермента, необходимое для полного гидролиза I мкг ДНК фага λ в течение I часа при 37°C.

Поскольку размер ДНК фага λ известен, можно, зная количество сайтов рестрикции для той или иной рестриктазы, выразить активность фермента в молях сайтов за час и, исходя из этой величины, рассчитать количество фермента, необходимое для гидролиза какой-либо иной ДНК, отличной от ДНК фага λ

Пример:
Bam HI
ДНК 48,5 т.п.н. 5 сайтов
ДНК pBR 322 4,3 т.п.н. I сайт
Количество фермента, необходимое для гидролиза I мкг pBR 322 в течение I часа при 37°C =

$$= \frac{48,5 \times I}{4,3 \times 5} = 2,3 \text{ ед.}$$

Не стоит брать большой избыток фермента, т.к. практически любой из них загрязнен другими экзо- и/или эндонуклеазами. Поэтому добавление в реакционную смесь большого избытка фермента приводит лишь к неоправданному увеличению степени деградации препарата ДНК.

Ферменты непосредственно перед использованием можно разбавлять реакционным буферным раствором. Если предполагается длительное хранение разбавленного препарата, для разбавления используют буфер хранения (состав указывает предприятие изготовитель фермента), содержащий I00 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, свободного от нуклеаз.

Условия рестрикции

Обычно реакционная смесь содержит 0,I-5 мкг ДНК в объеме IO-50 мкл. Реакцию проводят в оптимальном для данной рестриктазы буфере (см., например, "Methods of Enzymology" v. 100, p. 3 или каталоги фирм BioLabs, BRL и др.).

Несмотря на разнообразие рестриктаз, для большинства из них можно использовать один из 3-х, приведенных в таблице I буферных растворов.

Таблица I

I x буфер	NaCl	tris-HCl pH 7.5	$MgCl_2$	2-меркаптоэтанол
Low	0	IO мМ	IO мМ	5 мМ
Medium	50 мМ	IO мМ	IO мМ	5 мМ
High	IOO мМ	50 мМ	IO мМ	5 мМ

В таблице 2 приведен перечень наиболее употребимых рестриктаз с указанием зависимости активности от концентрации соли, оптимального буфера, сайта рестрикции и их количества в ДНК фага λ и pBR 322.

Проведение реакции

Реакцию обычно проводят в пластиковых пробирках объемом 0,5 или I,5 мл. Большое количество реакций удобно проводить в титровальных платах, однако в этом случае надо по возможности свести к минимуму испарение воды из реакционных смесей.

I. В пробирку с ДНК добавьте стерильной воды или ТЕ до объема I8 мкл.

2. Добавьте 2 мкл IO х кратного буфера рестрикции и перемешайте.

3. Добавьте необходимое количество фермента и быстро перемешайте.

4. Поместите пробирку в термостат и инкубируйте необходимое время.

5. Остановите реакцию добавлением ЭДТА до концентрации IO мМ.

!!! Помните: рестриктазы быстро инактивируются при комнатной температуре. Храните ферменты в морозильной камере. Вынув фермент из холодильника, немедленно поставьте его в лед. Отбирать фермент необходимо новым или, в крайнем случае, автоклавированным носиком. Объем добавляемого фермента не должен быть больше I/IO объема реакционной смеси, т.к. в противном случае реакция может ингибироваться глицерином.

Метилирование ДНК

В ДНК могут быть метилированы основания цитозина и аденозина. В некоторых случаях это приводит к тому, что ДНК не разрезается той или иной рестриктазой. Так ДНК многих млекопитающих не разрезается SalGI , а ДНК E.coli плазмид и фагов не гидролизуется EcoRII, поскольку большинство используемых штаммов E.coli содержат dcm-метилазу, метилирующую внутренний цитозин в последовательности CC(A/T)GG. В случае необходимости рестрикции по EcoRII сайтам необходимо провести плазмиду или фаг через dcm^- штамм E.coli или использовать рестриктазу BstNI узнающую эти сайты, но не чувствительную к метилированию.

Метилирование ДНК in vitro часто используется при проведении генно-инженерных работ. В настоящее время в Институте доступны: BamHI метилаза, метилирующая внутренний цитозин в последовательности GGATC*C и EcoRI метилаза, метилирующая аденозин в последовательности GAA*TTC. После метилирования ДНК не разрезается соответственно BamHI и EcoRI.

Реакцию проводят в буфере следующего состава: IO мМ трис-HCl pH 7,5 для BamHI метилазы или IOO мМ трис- HCl pH

8,0 для EcoRI метилазы, I0 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 80 мкМ s-аденозилметионин. За единицу активности принято количество фермента, необходимое для полного метилирования всех сайтов рестрикции I мкг ДНК фага λ при 37°С в течение I часа.

Таблица 2

Рестриктаза	концентрация NaCl (мМ)				тип буфера	сайт рестрикции	λ	pBR 322
	0	50	I00	I50				
AluI	1	3	3	2	M	AG CT	50	16
AvaII	3	3	2	1	M	G G(A/T)CC	17	8
BamHI	1	2	3	3	H	G GATCC	5	1
BclI*	1	3	3	1	M	T GATCA	7	0
BglI	1	3	3	3	M	$GCCN_4$ NGGC	22	3
BglII	2	3	3	3	L	A GATCT	6	0
BspRI	3	3	3	3	M	GG CC	50	22
ClaI	3	3	3	2	M	AT CGAT	12	1
EcoRI	-	3	3	3	H	G AATTC	5	1
EcoRII	-	3	3	3	H	CC(A/T)GG	35	6
HaeII	3	3	3	2	L	PuGCGC Py	30	11
HincII	2	3	3	3	M	GTPy PuAC	34	2
HindIII**	2	3	3	3	M	A AGCTT	6	1
HinfI	2	3	3	3	M	G ANTC	50	10
KpnI	3	1	1	1	L	GGTAC C	2	0
MspI	3	3	3	3	M	C CGG	50	26
PstI***	3	3	3	3	M	CTGCA G	18	1
PvuI	1	2	3	3	H	CGAT CG	3	1
PvuII	3	3	3	3	M	CAG CTG	15	1
RsaI	3	3	3	3	M	GT AC	50	3
SacI					L	GAGCT C	2	0
SalGI	1	1	2	3	H	G TCGAC	2	1
Sau3A	3	3	3	3	M	GATC	50	22
SlaI					H	C TCGAG	1	0
SmaI****					-	CCC GGG	3	0
SphI	1	1	3	3	H	GCATG C	4	1
TaqI*****	3	3	3	2	L	T CGA	50	7

* - оптимум 60°С
** - оптимум 37-55°С
*** - оптимум 2I-37°С
**** - специальный буфер
***** - оптимум 65°С

1 - I0% активности
2 - I0- 30% активности
3 - 30-I00% активности

I. Введение концевой метки в ДНК

А. Введение метки с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4

Полинуклеотидкиназа осуществляет перенос γ фосфатных групп с АТФ на ОН - 5'-конец ДНК (прямая реакция). В присутствии АДФ она способна осуществлять также реакцию обмена между АТФ и фосфорилированным 5' концом ДНК. Первая реакция протекает более эффективно, но требует предварительного дефосфорилирования фгагмента ДНК с помощью фосфатазы.

Дефосфорилирование фрагментов ДНК

I. Реакцию проводите в пробирке "эппендорф". Смешайте.

90 мкл 50 мМ трис-HCl pH 8,0
I0 мкл ДНК фрагмента рестрикции (I-I0 мкг)
I мкл щелочной фосфатазы (0,0I-0,I е.а.)

Реакцию проводите при 37°С для фрагментов ДНК с тупыми или выступающими 5'-концами или при 65°С для фрагментов с выступающими 3'-концами. Время реакции 30 мин.

2. От фосфатазы избавьтесь, дважды экстрагируя ДНК равным объемом смеси фенола с хлороформом I:I, насыщенной 50 мМ трис-HCl pH 8,0.

3. Фенол из водной фазы удалите экстракцией 5-ю объемами эфира, насыщенного водой.

4. Добавьте к водной фазе I2,5 мкл 3 М NaAc pH 5,2 и 375

мкл этанола. Смесь инкубируйте при -70°С в течение I0 мин. Центрифугируйте 5 мин.

Примечание. Инкубатор на -70°С можно приготовить в термосе с широким горлом, залив в него 66% этанол и охладив до -70°С жидким азотом.

5. К осадку прибавьте 500 мкл этанола и сразу же, не ресуспендируя осадок, центрифугируйте I мин. Осадок подсушите под вакуумом.

Введение метки с помощью полинуклеотидкиназы на 5' конец дефосфорилированной ДНК

Реакция для фрагментов с выступающими 5' концами

I. Смешайте в пробирке "эппендорф"

5 мкл (I-50 пмоль) дефосфорилированного фрагмента ДНК
40 мкл бидистилированной воды
5 мкл 500 мМ трис-HCl pH 7,5, I00 мМ $MgCl_2$, 50 мМ ДТТ, I мМ спермидин, I мМ ЭДТА
50 мкКи $[\gamma-^{32}P]$ АТР (I000 Ки/ммоль), упаренных досуха
I мкл полинуклеотидкиназы Т4 (20 ед. акт.)

2. Реакцию проводите при 37°С в течение 30 мин.

Реакция для фрагментов с 3' выступающими или тупыми концами

I. Смешайте в пробирке "эппендорф"

5 мкл дефосфорилированной ДНК (I-50 пмоль)
35 мкл 20 мМ трис-HCl pH 9,5, I мМ спермидин, 0,I мМ ЭДТА.

2. Прогрейте смесь при 90°C в течение 2 мин, быстро охладите во льду и перенесите в пробирку, содержащую:

5 мкл буфера 500 мМ трис-HCl pH 9,5, 100 мМ $MgCl_2$, 50 ДТТ, 50% (об/об) глицерина
50 мкл H_2O
50 мкКи (γ-^{32}P) АТФ 1000 Ки/ммоль, упаренных досуха
1 мкл полинуклеотидкиназы Т4 (20 ед.)

3. Реакцию проводите при 37°C в течение 15 мин.

Введение метки с помощью полинуклеотидкиназы Т4 на 5' конец **фосфорилированной** ДНК. Реакция обмена.

1. Смешайте

5 мкл ДНК с 5'-концевым фосфатом (1-50 пмоль)
36 мкл H_2O
5 мкл 500 мМ имидазол-HCl pH 6,6, 100 мМ $MgCl_2$, 50 мМ ДТТ, 1 мМ спермидин, 1 мМ ЭДТА
3 мкл 5 мМ АДФ
100 мкКи (γ-^{32}P) АТФ 1000 Ки/ммоль, упаренных досуха
1 мкл полинуклеотидкиназы Т4 (20 ед.)

2. Реакцию проводите при 37°C в течение 30 мин.

После окончания реакции фосфорилирования от избытка γ-АТФ избавьтесь гель-фильтрацией на G-50, P-6 или подвергая продукты реакции гель-электрофорезу.

Б. Введение концевой метки в ДНК с помощью фрагмента Кленова

1. ДНК гидролизуйте соответствующей рестриктазой, дающей 5' выступающие концы. Смешайте.

25 мкл ДНК плазмиды 500 мкг/мл
18 мкл H_2O
5 мкл (x10) буфера для рестрикции (например, 500 мМ NaCl, 500 мМ трис-HCl pH 8,0, 100 мМ $MgCl_2$, 20 мМ ДТТ)
2 мкл рестриктазы 40 ед. акт.

Реакцию проводите в течение 1 часа при 37°C.

2. Реакционную смесь охладите во льду и перенесите в пробирку, содержащую меченный ^{32}P дХТФ (50 мкКи) в виде сухого осадка.

3. Добавьте к смеси по 4 мкл 2,5 мМ растворов остальных немеченных дХТФ, комплементарных основаниям в выступающем конце. Добавьте 1-5 ед фрагмента Кленова.

4. Инкубируйте смесь 15 мин при комнатной температуре.

5. Добавьте к смеси 4 мкл 2,5 мМ раствора немеченного нуклеотидтрифосфата, по которому включалась метка и проводите инкубацию еще 5 мин.

6. Добавьте вторую рестриктазу в количестве, необходимом для полного гидролиза ДНК. Фрагмент Кленова можно не инактивировать.

7. Смесь инкубируйте 1 час при 37°C.

8. Добавьте 5 мкл 0,4 М ЭДТА, 15 мкл 70% глицерина, содержащего 0,1% бромфенола и 10 мкл 10 х буфера для электрофореза (10хТБЕ).

9. Нанесите образцы на гель и проведите электрофорез.

П. Мечение ДНК методом ник-трансляции

Меченные радиоактивные предшественники (дезоксинуклеотидтрифосфаты) производства Ленинград (^3H) и Ташкент (^{32}P) поставляются в 50% этаноле, поэтому перед реакцией их необходимо упаривать. В одной реакции обычно используется I0-20 мкКи. В случае ^{32}P достаточно одного предшественника. В случае ^3H желательно, чтобы все трифосфаты были меченные (это обусловлено удельной активностью препаратов). Для реакции достаточно 0,I-I0 мкг ДНК. Коммерческие препараты ДНК-полимеразы I редко бывают свободными от эндонуклеаз, производящих ники в молекулах ДНК. Если же фермент свободен от примесей эндонуклеаз, то в реакционную смесь необходимо добавлять ДНКазу I. Оптимальное количество ДНКазы определяют эмпирически. Обычно используют I0 нг-I мкг/мл. Реакцию ведут в буфере следующего состава (xI0):

I0 x Ник буфер

I00 мМ трис-HCl pH 7.5
I00 мМ $MgCl_2$
I М NaCl
50 мМ 2-меркаптоэтанол
I3 мМ спермидин
0,I% тритон X-I00

Добавление в буфер спермидина и тритона позволяет метить препараты ДНК с примесями полисахаридов (при элюции из агорозных гелей).

I. В пробирку с высушенным радиоактивным предшественником добавьте:

I-I0 мкл ДНК (I-3 мкг)
по I мкл трех остальных дХТФ I мМ
3 мкл I0 x ник буфера
3-5 ед.акт. ДНК-полимеразы I
I мкл ДНКазы I (I00 нг/мл)

H_2O до 30 мкл

Реакцию проводите сначала при 37°C в течение 30 мин, затем при I8-22°C, 0,5-3 часа в зависимости от чистоты ДНК. (При инкубации меченной ДНК в этих условиях уменьшения ДЕ-связанного материала обычно не происходит.)

2. Для определения количества включившегося предшественника 0,5-I мкл реакционной смеси нанесите на фильтр ДЕ 8I диаметром 2,3 см (Whatman). Не включившиеся предшественники смывайте с фильтра 0,25 М К-фосфатным буфером pH 7,0. ^3H просчитайте в толуольном сцинтилляторе (эффективность счета ^3H нуклеотидтрифосфатов, включившихся в ДНК, в 3 раза выше, чем у свободных), ^{32}P - в сухом сцинтилляционном стакане (по Черенкову). В первом случае фильтр необходимо тщательно высушить, во втором - не обязательно. Эффективность счета не учитывайте, исходите из показаний счетчика. Обычно процент включения составляет: ^{32}P - 30-80%, для ^3H - I0-30%, удельная активность: для ^{32}P 5x $I0^6$ - 5x $I0^7$ срм/мкг, для ^3H - $I0^6$-$I0^7$ срм/мкг ДНК.

3. Остановите реакцию добавлением стоп-буфера (I% SDS, 20 мМ ЭДТА) и 50-I00 мкг ДНК-носителя (озвученная ДНК из тимуса теленка или из спермы лосося).

Для разделения фрагментов ДНК обычно используют агарозные или полиакриламидные гели. Наиболее распространенные буферные системы приведены в таблице I.

Таблица I

буфер		состав концентрированного буфера
TAE	50 x	242 гр. трис 57,I мл ледяная уксусная кислота 18,6 гр. ЭДТА
TBE	I0 x	I08 гр. трис 55 гр. борная кислота 9,3 гр. ЭДТА

pH буфера может варьировать от 7,5 до 8,5, что практически не сказывается на качестве разделения.

А. Электрофорез в агарозных гелях

Агарозные гели, как правило, применяют для разделения ДНК размером более I т.п.н. В таблице 2 приведен диапазон эффективного разделения линейных молекул ДНК при различных концентрациях агарозного геля.

Таблица 2

% геля	диапазон (т.п.н.)
0,3	60-5
0,6	20-I
0,7	I0-0,8
0,9	7-0,5
I,2	6-0,4
I,5	4-0,2
2,0	3-0,I

Эффективность разделения в агарозном геле не зависит от состава ДНК и температуры. Обычно электрофорез ведут при комнатной температуре. Большое значение имеет напряженность электрического поля, с увеличением которого понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт на см геля.

Конформация ДНК. Суперскрученная, кольцевая и линейная молекулы ДНК имеют различную подвижность в агарозных гелях. Их относительная подвижность зависит от концентрации геля, напряженности поля, ионной силы буфера. Обычно максимальную подвижность имеет суперскрученная форма, затем линейная, а минимальную - кольцевая.

Приготовление агарозного геля

I. Смешайте необходимые количества агарозы, концентрированного электродного буфера и воды (для агарозных гелей обычно используют TAE, но можно использовать и TBE).

2. Нагрейте на водяной бане или на плитке при постоянном перемешивании до полного растворения агарозы.

3. Остудите раствор приблизительно до 50°C (T°, которую терпит рука). На этом этапе можно добавить бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл. В этом случае не надо окрашивать гель после проведения электрофореза.

4. Приготовьте ванночку для заливки геля и установите в ней гребенку для формирования карманов таким образом,

чтобы между зубьями гребенки и дном ванночки остался просвет около I мм.

5. Залейте расплав геля в ванночку и оставьте до полной полимеризации геля.

6. Аккуратно выньте гребенку и перенесите гель в камеру для электрофореза.

7. Залейте в камеру электродный буфер так, чтобы слой буфера над гелем был около I мм. В буфер можно добавить бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл.

8. Добавьте в анализируемые образцы I/I0 объема раствора, содержащего 50% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий и/или ксиленцианол, тщательно перемешайте и нанесите в карманы.

9. Подайте необходимое напряжение на электроды. ДНК движется от (-) к (+).

Б. Электрофорез ДНК в полиакриламидных гелях

Для разделения фрагментов ДНК длиной менее I т.п.н. используют ПААГ 2-х типов: нативный (без мочевины) для разделения двухцепочечных фрагментов и денатурирующий, содержащий 6-8 М мочевину, - для разделения одноцепочечных фрагментов.

В таблице 3 приведен диапазон эффективного разделения фрагментов ДНК при различных концентрациях геля.

Эффективность разделения. Подвижность фрагментов ДНК в денатурирующем ПААГ зависит от их состава. Напряжение, при котором ведется электрофорез, не имеет принципиального значения. При проведении электрофореза в нативных условиях следите за тем, чтобы гель не перегревался, т.к. это может привести к плавлению цепей низкомолекулярных фрагментов. При проведении электрофореза в денатурирующих условиях разогрев геля даже желателен, но чрезмерно большой ток может привести к искривлению фронта и растрескиванию стекла.

Таблица 3

% АА	диапазон разделения (п.н., н.)	
	нативный ПААГ	денатурирующий ПААГ
3,5	I00-I000	
4		200
5	80- 500	80-200
8	60- 400	40-I00
I2	40- 200	I0- 50
20	I0- I00	20

Подвижность ДНК в ПААГ. О разделении фрагментов ДНК в ПААГ можно судить по положению маркерных красителей. В таблице 4 приведены размеры ДНК, мигрирующие с маркерными красителями в ПААГ различной концентрации.

Таблица 4

% геля	нативный ПААГ		денатурирующий ПААГ	
	ВР	ХС	ВР	ХС
3,5	I00	460		
5	65	260	35	I30
6			26	I06
8	45	I60	I9	70-80
I0			I2	55
I2	20	70		
20	I2	45	8	28

Разделяющая способность ПААГ довольно высока. На I мм^2 площади дна кармана может быть нанесено до 0,I мкг ДНК.

Приготовление ПААГ

I. Для ПААГ используют ТБЕ-буфер.

2. Раствор мономеров: обычно готовится 30% или 40% раствор с соотношением АА/бисАА = 30/I. Раствор хранится длительное время при 4^{o}C.

	30% р-р	40% р-р
акриламид	29 гр	38,7 гр
метиленбисакриламид	I гр	I,3 гр
вода	до I00 мл	до I00 мл

Примечание. акриламид токсичен. Работайте в перчатках.

3. Приготовьте I0% водный раствор персульфата аммония (ПСА).

Примечание. ПСА быстро разлагается в водных растворах. Для приготовления раствора старайтесь брать не обводненные партии кристаллического ПСА. Раствор хранится при 4^{o}C не более недели.

Для приготовления нативного ПААГ рассчитайте и смешайте необходимое количество раствора мономеров, концентрированного электродного буфера и воды. Добавьте I/I00-I/500 объема I0% ПСА. Профильтруйте раствор под вакуумом через ватман или стеклянный фильтр типа GF/A, GF/B, GF/C.

Для приготовления денатурирующего ПААГ проведите аналогичный расчет, смешайте необходимое количество мочевины (конечная концентрация в геле должна быть 6-8 М), мономеров и воды. Для деионизации мономеров и мочевины добавьте смесь ионообменных смол типа Amberlite. Оставьте при пос-

тоянном перемешивании на 0,5-I час при комнатной температуре. Профильтруйте под вакуумом необходимое количество концентрированного электродного буфера, затем раствор мономеров с мочевиной. К фильтрату добавьте I/I00-I/500 объема I0% ПСА.

Полимеризация геля

I. Для полимеризации геля добавьте ТЕМЕД из расчета 30 мкл на I00 мл геля. Быстро перемешайте и залейте без пузырей между заранее приготовленными стеклами.

Метод заливки геля не имеет принципиального значения и различается в разных лабораториях и группах. Поэтому в настоящем пособии не описывается.

2. Вставьте гребенку для формирования карманов и оставьте до полимеризации геля, которая обычно проходит за 5-I5 мин, но не более часа.

3. Выньте гребенку, от остатков незаполимеризовавшегося акриламида немедленно промойте карманы дистиллированной водой.

4. Установите гель в камеру для электрофореза, заполненную ТБЕ буфером, и подайте напряжение на электроды.

5. Проведите преэлектрофорез (I час или более).

6. По окончании преэлектрофореза промойте карманы, нанесите образцы и подайте напряжение на электроды.

Приготовление образцов

I. При проведении электрофореза в денатурирующих условиях растворите образец в 90% формамиде, содержащем 0,02% маркерных красок. Прогрейте на кипящей бане I мин, быстро остудите, после чего нанесите на гель.

2. При проведении электрофореза в нативных условиях добавьте к образцу I/I0 объема раствора, содержащего 50% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий и/или ксиленцианол, перемешайте и нанесите на гель.

ТРАНСФОРМАЦИЯ E.coli МН-1 ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРИСТОГО МАРГАНЦА

В настоящее время методы трансформации клеток E.coli плазмидной ДНК получили значительное распространение. Широко используются методы трансформации, в основе которых лежит получение компетентных клеток E.coli с помощью хлористого кальция и хлористого рубидия (Маниатис и др., I985).

Данная методика воспроизводимо дает $5 \cdot 10^7$ трансформантов на I мкг суперскрученной ДНК pBR 327. Компетентные клетки штамма МН-1 можно приготовить в больших количествах (I00-200 фасовок) и хранить замороженными без потери в эффективности трансформации по крайней мере в течение нескольких месяцев.

А. Подготовка компетентных клеток

I. Внесите I мл ночной культуры МН-1 (rec A^+) производный JM в 500-мл колбу со I00 мл LB. Наращивайте клетки при 37°C с интенсивным перемешиванием до $Д_{550}$ = 0.3.

2. Соберите клетки центрифугированием при 4000 об/мин, I0 мин, 0°C.

3. Отбросьте супернатант и суспендируйте клетки в 25 мл ледяного (0-4°C) буфера I.

4. Соберите клетки центрифугированием при 4000 об/мин, I0 мин, 0°C.

5. Удалите супернатант как можно более полно и суспендируйте клетки в 5 мл ледяного буфера II.

6. Расфасуйте клеточную суспензию по 200 мкл в предваритель-

но охлажденные стерильные пластиковые микропробирки и поставьте их замораживаться в морозильник на -70°C (можно на -50°C). Хранить компетентные клетки следует при температуре замораживания.

Примечание. Операции, перечисленные в пп. 3, 5, 6, выполняются на льду и, чем быстрее они будут проведены, тем лучше. Необходимо также помнить, что клетки становятся компетентными только после замораживания.

Б. Трансформация

I. Оттайте на льду пробирку с компетентными клетками. Эта стадия не является критической и после оттаивания клетки можно оставлять на льду до I часа.

2. Перенесите клеточную суспензию в предварительно охлажденную тонкостенную пробирку (стеклянную) и добавьте ДНК (не более 25 нг) в объеме не более 40 мкл. Перемешайте суспензию.

3. Инкубируйте реакционную смесь на льду в течение 30 мин.

4. Поместите пробирку в термостат на 42°C и инкубируйте 2 мин.

5. Добавьте I мл LB и инкубируйте I час без перемешивания при 37°C.

6. Высейте на соответствующую селективную среду.

Буферы

Буфер I

30 мМ KAc
50 мМ $MnCl_2$
I0 мМ $CaCl_2$
I00 мМ KCl
I5% глицерин
pH 5.8

Буфер II

I0 мМ MOPS
I0 мМ KCl
75 мМ $CaCl_2$
I5% глицерин
pH 6.5

Стерилизуйте буферы фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. Буфер I перед стерилизацией необходимо профильтровать для удаления нерастворившегося $MnCl_2$.

Примечание. Перед тем, как приготовить компетентные клетки в большом количестве, вырастите их в 20 мл LB и поставьте пробную трансформацию для проверки качества буферов. При увеличении или уменьшении объема наращиваемых клеток соответственно изменяйте объемы буферов.

Гибиридизация между комплементарными нитями нуклеиновых кислот стала одним из мощных инструментов молекулярной биологии. Метод основан на том, что две комплементарные нити в двойной спирали ДНК или ДНК/РНК дуплексе можно разделить денатурацией, а затем отжечь (гибридизовать) в условиях, благоприятных для образования водородных связей между основаниями. Одним из самых общеупотребимых применений методов гибридизации являются процедуры in situ, где одна из отжигаемых нитей иммобилизована. Многое в этой процедуре основано на использовании нитроцеллюлозы для иммобилизации ДНК (Nygaard, 1964). Саузерн (1975) и Элвин (1977) ввели оригинальные варианты основной процедуры. Обычно комплементарная меченная нить добавляется как растворимый зонд который после гибридизации можно локализовать авторадиографией

Быстрота, высокая чувствительность, технологическая простота метода гибридизации нуклеиновых кислот на твердом носителе сделали его незаменимым в практике генетической инженерии для скрининга рекомбинантных клонов. Обсуждаемый метод позволяет одновременно проводить скрининг до десятков, сотен тысяч индивидуальных клонов. Скрининг рекомбинантных клонов методом молекулярной гибридизации in situ можно разбить на два самостоятельных этапа, которые разносятся по времени на удобный для экспериментатора срок. Первый этап связан с иммобилизацией ДНК на твердой фазе. Второй - относится к собственно гибридизации иммобилизованной ДНК с меченным зондом.

А. Перенос на фильтры небольшого количества бактериальных колоний

Скрининг небольшого числа бактериальных клонов обычно проводится в двух случаях:

I. Если получено от 100 до 500 трансформантов на нескольких чашках.

II. Если заведомо известно, что выход интересующего рекомбинанта среди полученных трансформантов высокий.

Для переноса бактериальных колоний на нитроцеллюлозный фильтр и матричную чашку нарезают полоски из плотной бумаги (например, из перфокарт) размером 1 x 2 см и стерилизуют их сухожаром в чашке Петри при температуре 150°С в течение 1-1,5 ч.

1. Приготовьте две чашки с агаром, содержащим необходимый антибиотик. На поверхность агара одной из чашек поместите нитроцеллюлозный фильтр (НЦФ), предварительно стерилизованный УФ-светом. Фильтр и матричную чашку необходимо ориентировать, пометив их фломастером. Если шаблон нанесения бактериальных колоний асимметричен, то необходимость в ориентации НЦФ и матричной чашки отпадает.

2. Перенос бактериальных колоний на НЦФ и матричную чашку осуществляйте уколом по шаблону уголком полоски бумаги (можно использовать оба уголка полоски).

3. Положите чашки в термостат на 37°С вверх дном. Инкубируйте до появления 1-2 мм-колоний.

4. Снимите НЦФ с выросшими колониями нестерильно. Обработайте НЦФ по ниже описанной методике. Матричную чашку замотайте парафильмом и храните в холодильнике.

Примечание. Для получения достоверных результатов гибридизации на НЦФ необходимо нанести несколько клонов бактерий с исходным вектором в качестве негативного контроля. Если гибридизацию нужно вести с несколькими зондами, то высев трансформантов можно производить на соответствующее количество НЦФ. Можно также последовательно гибридизовать один НЦФ с каждым зондом с последующей отмывкой от предыдущего специфично связавшегося зонда. Отмывку зонда можно производить в 2xSSC при температуре плавления образовавшегося в результате гибридизации дуплекса.

Б. Перенос на фильтры большого количества бактериальных колоний

Этот вариант скрининга обусловлен низким выходом интересующего рекомбинантного клона. Высев колоний в этом случае можно производить до нескольких десятков тысяч на 90-мМ чашку (лучше не более 30 000). Вместо нитроцеллюлозы для переноса бактериальных клонов лучше использовать бумагу Whatman 542 (или 540, 541), так как в этом случае не требуется исключительных навыков по сдергиванию колоний с агара и, в отличие от НЦФ, не возникает проблем с неполным или неравномерным отпечатыванием колоний на фильтре. Гибридизацию зонда с ДНК, иммобилизованной на бумажных фильтрах проводят так же, как и в случае с НЦФ (см. далее).

1. Вырезанные по размеру чашки бумажные диски Whatman 542 стерилизуйте УФ-светом в течение 20-30 мин. Диски должны быть заранее подписаны шариковой ручкой или простым карандашом.

2. Достаньте чашки из термостата. Стерильным пинцетом поместите бумажный диск на поверхность агара с колониями и быстро прижмите его пинцетом по всей площади. Намокание диска должно быть равномерным и одновременным во избежание его деформаций, препятствующих нормальному переносу бактериальных колоний. Следите за тем, чтобы между агаром и диском не было пузырьков воздуха.

3. С помощью стерильной препаровальной иглы сделайте сквозные уколы, оставляющие заметный след на агаре. Уколы должны быть асимметричны для однозначной ориентации фильтра относительно чашки.

4. Фильтр осторожно снимите с агара, чашку закройте и поставьте в термостат на 37°С. Через 1-2 суток матричную чашку достаньте из термостата, замотайте парафильмом и храните в холодильнике до получения результатов гибридизации.

5. Фильтр с отпечатанными колониями обработайте согласно описанной ниже методике.

Примечание. Для получения нескольких реплик с одной матричной чашки необходимо бумажный фильтр с иммобилизованными бактериальными колониями отпечатать на нитроцеллюлозный фильтр, помещенный на агар с нужным антибиотиком. После получения "сэндвича" необходимо сделать проколы НЦФ через маркерные отверстия на бумажном фильтре. Чашки с нитроцеллюлозными фильтрами поставьте в термостат на 37°С вверх дном.

В. Перенос на фильтры бляшек бактериофага λ

В зависимости от поставленной задачи на одну чашку высевается 10^2-10^5 бляшкообразующих частиц. Чашки с агаром необходимо готовить за двое суток до эксперимента. Для высева адсорбированного бактериофага целесообразно верхний агар заменить на верхнюю агарозу, так как при переносе бляшек на НЦФ верхний агар часто отрывается от нижнего.

1. Достаньте чашку с бляшками фага λ из термостата и положите ее в холодильник на 1-2 ч.

2. Пометьте НЦФ шариковой ручкой с обратной стороны и стерилизуйте его УФ-светом в течение 20-30 мин.

3. Наложите НЦФ на газон с бляшками. Следите за тем, чтобы между фильтром и верхней агарозой не было пузырьков воздуха, препятствующих переносу бактериофага λ на фильтр.

4. После того, как фильтр полностью намокнет, проделайте в нем маркерные сквозные отверстия с помощью стерильной препаровальной иглы. След от иглы на чашке должен быть заметным.

5. Осторожно снимите фильтр с чашки и положите его на фильтровальную бумагу бляшками кверху. Далее обработку фильтров проводите согласно описанной ниже процедуре.

Примечание. С одной чашки можно снять до семи реплик. Время адсорбции для каждой последующей реплики необходимо увеличивать. Для получения достоверной информации о гибридных клонах необходимо с каждой чашки снимать по две реплики. Получив информацию о гибридизации на двух фильтрах, нужно сравнить позитивные сигналы и отбросить те, которые не совпадают на обоих фильтрах как неспецифические сигналы.

Г. Амплификация бактериофага λ in situ

Процедура не лишена смысла особенно в том случае, когда зонд имеет низкую удельную радиоактивность или частичную гомологию с ДНК интересующего клона. Амплификацию бактериофага λ проводят на НЦФ.

I. Стерильные НЦФ, подписанные с обратной стороны, окуните в суспензии магниевых клеток бактерий-хозяев с оптической плотностью D_{550} = 0,2-0,3. Фильтры подсушивайте на стерильной фильтровальной бумаге в течение 0,5-I ч.

2. Перенос бактериофага на НЦФ, импрегнированные бактериями, осуществляйте согласно пп. 3, 4 предыдущей главы.

3. Отпечатанные фильтры поместите на свежем агаре бляшками вверх и инкубируйте в термостате на 37°C в течение I2-I6 ч. Матричные чашки обмотайте парафильмом и храните в холодильнике до получения результатов гибридизации.

4. Снимите НЦФ с чашек нестерильно и обработайте их согласно описанной ниже методике.

Д. Подготовка фильтров для гибридизации

Для гибридизации ДНК бактерий и бактериофага с меченным зондом необходимо высвободить ДНК, денатурировать и зафиксировать ее на фильтре.

I. Лизис клеток и фаговых частиц проводите на листе фильтровальной бумаги, обильно смоченной 0,5 М NaOH. В зависимости от количества фильтров эту процедуру можно выполнять либо в чашке Петри, либо в лотке. Фильтры кладите колониями и бляшками вверх. Следите за тем, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Денатурацию проводите в течение 5 мин. при комнатной температуре. После этого положите фильтры на сухой лист фильтровальной бумаги, чтобы удалить остатки щелочи.

2. Нейтрализацию проводите в I М трис-HCl, pH 8.0 по той же технологии, что и денатурацию.

3. Положите фильтры на фильтровальную бумагу, смоченную 2xSSPE (20xSSPE - 3,6 М NaCl, 200мМ NaH_2PO_4, pH 7,4, 20 мМ ЭДТА) или 2xSSC (20xSSC - 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7.0) на 5 мин. Перенесите фильтры на сухую фильтровальную бумагу, дайте им подсохнуть в течение I0-I5 мин.

4. Поместите фильтры между двумя листами Whatman 3 MM. Фиксацию ДНК проводите при 80°C в вакууме в течение I ч. После сушки фильтры можно хранить в вакууме при ком-

натной температуре сколь угодно долго.

Е. Гибридизация ДНК, иммобилизованной на фильтрах, с меченными зондами

Гибридизация с олигонуклеотидными зондами (не более 50 нуклеотидных звеньев).

I. Рассчитайте температуру гибридизации ($T_г$) по одной из следующих формул:

(а) $T_г = 2\Sigma(A + T) + 3\Sigma(G + C)$

(б) $T_г = 2\Sigma(A + T) + 4\Sigma(G + C) - 5$

(в) $T_г = 1{,}24\ T_{пл} - 43{,}8$

где $T_{пл}$ - температура плавления

$T_{пл} = 81{,}5^oC + 16{,}6\ lg[Na^+] + 0{,}41(\%G + C) - 500/n - 0{,}61(\%\ фомамида)$,

где n - количество нуклеотидов в дуплексе.

2. Положите фильтр с иммобилизованной ДНК на поверхность раствора для гибридизации (6xSSC раствор, Денхардт x I, 25мкг/мл суммарной РНК из дрожжей). После полного намокания фильтр утопите. Меченный зонд добавляйте при $T_г$ гибридизационного раствора. Гибридизацию проводите в течение 30-40 мин.

Раствор Денхардта (50 x)

фикол I г
поливинилпирролидон I г
BSA (Pentax Fraction V) I г
H_2O до I00 мл

Храните при -20^oC

3. Отмойте фильтры от несвязавшегося зонда в следующем режиме: 3 раза по I0 мин при комнатной температуре в 5x SSC в объеме 50 мл на один фильтр размером I0 см в диаметре; инкубация при $T_г$ в 5xSSC в течение 30 мин.

4. Удалите остатки жидкости с фильтров на фильтровальной бумаге. Зафиксируйте фильтры на стекле с помощью клейкой ленты. Накройте их лавсановой пленкой (Saran Wrap). Для ориентации фильтров сбоку наклейте полоску бумаги с радиоактивным рисунком (лучше всего использовать чернила с изотопом ^{14}C). Приложите рентгеновскую пленку к стеклу с фильтрами. Накройте сверху вторым стеклом для полного контакта. Экспонируйте несколько часов.

5. После проявления совместите пленку с фильтрами с помощью радиоактивного рисунка. Фломастером на пленке отметьте положение маркерных отверстий на фильтре. Обведите контуры фильтров (если они не видны на пленке). Разрежьте пленку по контурам. Прикладывая пленку к чашкам, локализуйте клон, соответствующий позитивному сигналу на пленке. Если засев плотный, необходимо выколоть зону вокруг сигнала и сделать рассев для повторной гибридизации.

Примечание. Объем гибридизационного раствора должен соответствовать требованию полного погружения фильтров в нем. Концентрация зонда должна быть не меньше 0,5-I пкМ/мл. При гибридизации нескольких фильтров в одной чашке Петри время гибридизации увеличьте в 2-3 раза. Не допускайте высыхания фильтров при гибридизации. Следите за тем, чтобы между фильтрами не было пузырей воздуха.

Гибридизация с протяженными ДНК-, РНК-зондами

I. Рассчитайте температуру и время гибридизации по следующим формулам:

$$T_г = I,23\ T_{пл} \geq 43,8$$

$$T_{пл} = 8I,5^{o}C + I6,6\ lg[Na^{+}] + 0,4I(\%G + C) - 0,6I(\%\ формамида)$$

Каждый процент негомологичности последовательности ДНК понижает $T_{пл}$ на I,5°C.

Время гибридизации должно соответствовать времени достижения (I ÷ 3)$C_0 t_{1/2}$ Количество часов, за которое достигается величина $C_0 t_{1/2}$ определяется по формуле: $\frac{1}{X} \cdot \frac{Y}{5} \cdot \frac{Z}{10} \cdot 2$, где X - количество добавленного зонда в мкг; Y - сложность ДНК зонда, которая для большинства зондов пропорциональна длине зонда в единицах kb); Z - объем пробы в мл.

2. Положите фильтр на поверхность промывающего раствора (50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,I% SDS). После полного намокания фильтр утопите. Кристаллизатор с фильтрами поместите на подвижную платформу. Инкубацию проводите в течение I-2 ч при 42°C.

3. Предгибридизацию фильтров проводите в гибридизационном растворе при $T_г$ в течение 2-4 ч. Гибридизационный раствор содержит 5xSSPE (или 5xSSC), 5 x Денхардта, 0,I% SDS и I00-500 мкг/мл озвученной и денатурированной ДНК из спермы лосося.

4. Перенесите фильтры в гибридизационный раствор, содержащий меченный зонд. Перед добавлением в гибридизационный раствор прогрейте зонд при I00°C в течение 5-I0 мин и

охладите во льду.

5. После завершения гибридизации отмойте фильтры от несвязавшегося зонда в следующем режиме: 30 мин в 4xSSC 0,I% SDS, 30 мин в 2xSSC, 0,I% SDS, 30 мин в IxSSC; 0,I% SDS при комнатной температуре в 200 мл в кристаллизаторе на подвижной платформе. I ч в IxSSC и 0,I% SDS при $T_г$. При наличии фона - в 0,IxSSC, 0,I%SDS при $T_г$.

6. Далее выполняйте предписания пп. 4, 5 предыдущей методики.

Примечание. Если гибридизационный раствор получился мутным, отцентрифугируйте его на К-23 при 5 000 об/мин при комнатной температуре. Следите за тем, чтобы не происходило интенсивного упаривания гибридизационного раствора. Фильтры периодически взбалтывайте, чтобы избежать их слипания. Не допускайте попадания пузырей воздуха между фильтрами.

I. Метод определения первичной структуры ДНК по Максаму-Гилберту

А. Элюция фрагментов ДНК из геля путем диффузии в буфер

Описываемый метод рекомендуется как один из наиболее простых, воспроизводимых и дающих высокий выход. Электроэлюция на диализную мембрану или ДЭАЭ целлюлозу может быть использована также.

1. Кусочек геля, содержащий фрагмент ДНК, вырежьте безопасной бритвой или острым скальпелем, поместите в пробирку "эппендорф" (1,5 мл) или стеклянную гидрофобированную пробирку, измельчите стеклянной гидрофобированной палочкой и залейте 5–6 объемами (до образования жидкой суспензии) элюирующего буфера: 150 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl pH 7,5, 2 мМ ЭДТА. Оставьте суспензию при комнатной температуре на ночь.

   Примечание. Буферные растворы, используемые для элюции ДНК следует предварительно прокипятить 15 мин на водяной бане.

2. Суспензию центрифугируйте 1–2 мин и пипеткой отберите супернатант, содержащий ДНК:

3. К кусочкам полиакриламидного геля вновь добавьте элюирующий буфер до исходного объема. Суспензию встряхивайте на миксере 30 мин.

4. Суспензию вновь центрифугируйте, отберите супернатант и объедините его с первым. За выходом фрагмента из геля следите по счетчику радиоактивности. При необходимости повторите пп. 3, 4.

5. Собранный супернатант освободите от небольших кусочков геля, профильтровав раствор через стекловату, помещенную в носик от автоматической пипетки Р 5000, нанесите на колонку с ДЕ-52 (Whatman), приготовленную в желтом носике "эппендорф". Обычно берут 100–200 мкл суспензии, приготовленной на элюирующем буфере. Промойте колонку 1 мл элюирующего буфера.

6. Фрагмент смойте с колонки 400 мкл буфера: 1 М NaCl, 50 мМ трис-HCl pH 7,5, 2 мМ ЭДТА.

7. Добавьте к раствору фрагмента tРНК до концентрации 30 мкг/мл и осадите фрагмент, добавив 2 объема этанола. Выдержите пробирку на -70°С 10 мин, центрифугируйте 5 мин.

8. Полученный осадок растворите в 100 мкл 0,3 М NaAц pH 7,0, добавьте 220 мкл этанола, 10 мин при -70°С. Центрифугируйте 5 мин, осадок промойте (не ресуспендируя) в 0,5 мл этанола, подсушите под вакуумом и растворите в 20 мкл бидистиллированной воды.

С ДЕ-52 эффективно элюируются фрагменты до 500 пн, более крупные фрагменты вымываются с потерями. Вместо ДЕ-52 можно использовать элютипы d (S&S). В этом случае и крупные фрагменты смываются без потерь.

Б. Химические реакции расщепления ДНК

В настоящей прописи предлагается классический вариант метода Максама-Гилберта (Maxam, Gilbert, 1980) с модифика-

циями, сделанными в основном сотрудником ИМБ (Москва) А.С.Краевым. Метод может быть использован для определения первичной структуры ДНК однонитевых или двунитевых фрагментов различных размеров, включая и олигонуклеотиды. Все реакции проводят в пробирках "эппендорф", осадки получают на центрифуге 5414 этой же фирмы.

1. Четыре пробирки "эппендорф" подпишите следующим образом: "G", "G+A", "C+T", "C".

2. ^{32}P фрагмент ДНК, растворенный в 20 мкл H_2O распределите по пробиркам следующим образом:

"G"	"G+A"	"C+T"	"T"
4 мкл	5 мкл	7 мкл	4 мкл

3. Пробирки поместите в лед. Все реагенты добавьте на льду. Химические реакции проводите при 15-21°C, поместив пробирки в водяной термостат.

Химические реакции

Реакция по цитозину-"C"

В пробирку "C" добавьте 8 мкл 5 М NaCl, перемешайте и добавьте 15 мкл безводного гидразина (HZ)[1].

Реакция по тимину и цитозину - "T+C"

В пробирку "T+C" добавьте 10 мкл безводного гидразина.

Реакция по гуанину и аденину - "G+A"

В пробирку "G+A" добавьте 10 мкл муравьиной кислоты.

Реакция по гуанину - "G"

В пробирку "G" добавьте 100 мкл буфера: 50 мМ какодилат 8,0, 1 мМ ЭДТА и 1 мкл диметилсульфата.

[1] Получение безводного гидразина может быть организовано в КТМК ИЦиГ при наличии на него спроса.

Продолжительность химических реакций (мин).

реакция / размер фрагмента пн	G	A+G	T+C	C
30 и менее	10	25	50	100
300	1	2,5	5	10

При длине фрагмента ДНК более 300 пн реакцию по G проводят при 0°C.

Остановка реакций

"C" и "C+T"

1. После окончания реакции пробирки поместите на 2 мин в ледяную воду.
2. Добавьте в каждую пробирку по 150 мкл 0,3 М NaAц pH 7,0, энергично встряхните и добавьте по 2 мкл tРНК (2,5 мг/мл) и по 500 мкл этанола, перемешайте и сразу же центрифугируйте 5 мин. Супернатант слейте.
3. К осадкам добавьте 100 мкл 0,3 М NaAц pH 7,0 и 500 мкл этанола, центрифугируйте 5 мин, супернатант слейте.
4. К осадкам добавьте 500 мкл этанола и, не перемешивая осадки, центрифугируйте 1 мин. Спирт слейте, осадки подсушите под вакуумом.

Примечание. Растворы и посуду, загрязненные гидразином, следует сбрасывать в раствор 3 М $FeCl_3$, диметилсульфатом - в 5 М NaOH.

"G" и "A+G"

1. Добавьте в пробирку "G" 12 мкл 3 М NaAц pH 7,0, а в пробирку "A+G" 150 мкл 0,3 М NaAц pH 7,0, затем в обе пробирки по 2 мкл tРНК (2,5 мг/мл) и по 500 мкл этано-

ла. Перемешайте и центрифугируйте 5 мин. Супернатант слейте.

2. К осадку добавьте 500 мкл этанола и, не перемешивая осадок, центрифугируйте I мин. Осадки подсушите под вакуумом.

Расщепление ДНК по модифицированным основаниям

I. К осадкам добавьте по 100 мкл 10% свежеприготовленного раствора пиперидина и прогрейте все пробирки на кипящей водяной бане в течение 30-45 мин. При этом крышки всех пробирок должны быть плотно закрыты.

2. Поместите пробирки в ледяную воду. Добавьте в каждую пробирку по 30 мкл 3 М NaАц pH 7,0, 2 мкл tРНК (2,5 мг/мл) и 650 мкл этанола. Перемешайте и центрифугируйте 5 мин.

3. Растворите осадки в 100 мкл 0,3 М NaАц pH 7,0, прибавьте 500 мкл этанола, перемешайте и центрифугируйте 5 мин.

4. Осадки промойте I мл этанола, центрифугируйте I мин и подсушите под вакуумом.

5. Осадки растворите в 3-9 мкл деионизованного формамида, содержащего по 0,02% бромфенолового синего и ксиленцианола, выдержите образцы на кипящей водяной бане 2 мин и сразу же нанесите на полиакриламидный гель, содержащий 8 М мочевину. Обычно наносят до 3 мкл на старт 6х0,4 мм.

II. Определение первичной структуры ДНК методом Максама-Гилберта с использованием ацетонового осаждения

А. Электроэлюция ДНК из полиакриламидного геля

I. Полоску полиакриламидного геля, содержащую меченный фрагмент ДНК после препаративного электрофореза, поместите в камеру для электроэлюции, залейте в камеру буфер TBE и 100 мкг тРНК-носителя.

2. Перенос проводите на диализную мембрану электрофорезом при токе 5-10 ма на одну элюционную камеру. Контроль переноса осуществляйте по уменьшению радиоактивности полоски геля с помощью счетчика радиоактивности.

3. По окончании переноса отберите буфер из камеры пипеткой, оставив в отсеке у "+" электрода около I мл. Осторожно удалите верхний слой буфера, оставив примерно 200 мкл поверх мембраны, и перенесите в чистую пробирку. Оставшимся буфером тщательно промойте мембрану и перенесите его в другую чистую пробирку. Затем снимите мембрану и несколько раз прополоскайте ее внутреннюю поверхность буфером, перенесенным в первую пробирку. Остатками того же буфера промойте "+" отсек элюционной камеры.

4. В пробирку с фрагментом добавьте около 50 мкг тРНК-носителя и I/10 объема 3 М раствора ацетата натрия, перемешайте и расфасуйте в 4 пробирки для реакций.

5. В каждую пробирку добавьте 2,5-3 объема этанола, заморозьте в жидком азоте, дайте оттаять (лучше при -20°С) и центрифугируйте 5 мин. Спирт удалите с помощью водоструйного насоса, осадки высушите.

Б. Химические реакции расщепления ДНК

Модификация по гуанину (Реакция G)

I. К 95 мкл воды добавьте 5 мкл диметилсульфата, тщательно перемешайте.
2. Осадок ДНК в одной из пробирок растворите в 20 мкл воды и добавьте 5 мкл 5%-го раствора диметилсульфата. Инкубируйте в зависимости от длины фрагмента от 10 сек (фрагменты до 2000 пар) до 2 мин (около 100 пар).
3. Добавьте 300 мкл 2%-го раствора перхлората лития в ацетоне, перемешайте и центрифугируйте 30 сек.
4. Супернатант осторожно (!) удалите автоматической пипеткой.
5. Осадок промойте ацетоном и 96%-ным этанолом и подсушите.

Модификация по пуринам (Реакция A+G)

I. Осадок ДНК растворите в 8 мкл воды и добавьте 16 мкл концентрированной муравьиной кислоты. Инкубируйте в 2 раза дольше, чем в реакции "G".
2. Осаждение и промывки - как в реакции "G".

Модификация по пиримидинам (Реакция T+C)

I. К осадку ДНК прибавьте 15 мкл гидразина или гидразингидрата, инкубируйте на шейкере в три раза дольше, чем в реакции "A+G".
2. Осаждение и промывка как в предыдущих реакциях.

Модификация по цитозину (Реакция C)

I. К осадку ДНК добавьте 15 мкл 3 М раствора хлористого натрия в гидразингидрате. Инкубируйте на шейкере как в реакции "T+C".
2. Добавьте 300 мкл 2%-го раствора перхлората лития в ацетоне, перемешайте и центрифугируйте 30 сек. Выпадает белый плотный осадок.
3. Супернатант удалите пипеткой, а к осадку добавьте 300 мкл 70%-го этанола. Осадок тщательно суспендируйте и центрифугируйте 30 сек.
4. Осадок промойте 96%-ным этанолом, высушите.

Гидролиз пиперидином

I. Приготовьте 10%-ный раствор пиперидина в воде по количеству образцов (на I образец - 100 мкл). Пиперидин необходимо вливать под воду.
2. Добавьте во все пробирки по 100 мкл 10%-го пиперидина, инкубируйте на кипящей бане 15 мин.
3. Добавьте во все пробирки по I мл 2%-го перхлората лития в ацетоне, перемешайте, плотно закрыв крышку пробирки.
4. Центрифугируйте 30 сек, супернатант осторожно удалите автоматической пипеткой.
5. Осадки дважды промойте ацетоном и один раз этанолом.
6. Осадки высушите и растворите в формамиде, содержащем ксиленцианол и бромфеноловый синий. Количество формамида для растворения образца определяйте уровнем радиоактивности. Для определения уровня радиоактивности пробирку поместите в сцинтилляционный флакон (пустой) и просчитайте в ^{3}H-канале счетчика. Для работы используйте образец с радиоактивностью около 20 тыс. имп./мин в 2-3 мкл раствора.

III. Метод определения нуклеотидной последовательности ДНК по Максаму-Гилберту на твердой фазе

(Чувпило, Кравченко, 1983)

А. Электроэлюция ДНК из геля на ДЭАЭ-целлюлозу

1. Обработка ДЭАЭ-целлюлозы.
   ДЭАЭ-целлюлозу DE-81 (примерно 100 $см^2$) инкубируйте в 20 мл раствора ДНК из тимуса теленка (100 мкг/мл) в течение 10 мин. Избыток ДНК отмойте в 100 мл H_2O, затем проинкубируйте целлюлозу при легком покачивании (на шейкере) в 20 мл 2 М $LiClO_4$ в течение 20 мин, отмойте в 100 мл H_2O и высушите на воздухе. ДЭАЭ-целлюлоза может использоваться в течение года.

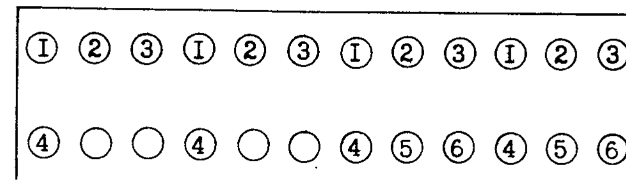
2. Фрагмент ДНК, меченный ^{32}P по 3'-концу вырежьте из геля (после препаративного электрофореза) и с помощью электроэлюции в ТБЕ буфере перенесите на предварительно обработанную DE-81 целлюлозу.

3. После электроэлюции DE 81 целлюлозу с иммобилизованным фрагментом ДНК промойте последовательно 5 мл 20 мМ ЭДТА pH 8,0, 5 мл этанола и высушите на воздухе.

Б. Реакции химического расщепления ДНК

Высушенную DE 81 целлюлозу разрежьте на 4 части с соотношением радиоактивности 1 / 2 / 2 / 1 (для проведения соответственно реакций G / G+A / T+C / C).

Модификацию ДНК проводите в планшете для иммунологических реакций (96 лунок), приготовленном для этого согласно схеме



G G+A T+C C

1 – DE 81 целлюлоза с иммобилизованной ДНК
2 – Этанол 1 (200 мкл)
3 – Этанол 2 (200 мкл)
4 – H_2O (200 мкл)
5 – Ацетилацетон 1 (50 мкл) } 5% ацетилацетон в этаноле
6 – Ацетилацетон 2 (50 мкл) }

1. Специфические модификации ДНК

Модификация по гуанину "G"

Нанести на DE 81 целлюлозу 3,5 мкл свежеприготовленного 1% диметилсульфата в 50 мМ формиата аммония pH 3,5. Инкубируйте 40÷60 сек. Остановите реакцию добавлением 200 мкл 5% раствора 2-меркаптоэтанола в этаноле.

Модификация по пуриновым основаниям "A+G"

Нанесите на DE 81 целлюлозу 5,5 мкл 66% муравьиной кислоты. Реакцию проводите 2,5÷4 мин. Остановите реакцию добавлением 200 мкл этанола.

Модификация по пиримидиновым основаниям "T+C"

Нанесите на DE 81 целлюлозу 5,5 мкл гидразингидрата. Реак-

цию проводите 7÷10 мин. Остановите реакцию добавлением 200 мкл этанола.

Модификация по цитозину "С"

Нанесите на DE 81 целлюлозу 3,5 мкл 1,5÷2% NaOH в гидразингидрате. Реакцию проводите 7÷10 мин. Остановите реакцию добавлением 200 мкл этанола.

2. Отмывка ДЭАЭ-целлюлозы от химических реагентов

а) Перенесите DE 81 целлюлозу с иммобилизованной ДНК, модифицированной по "G" и "A+G" в этанол I, промокнув предварительно на фильтровальной бумаге.

б) Перенесите DE 81 целлюлозу с иммобилизованной ДНК, модифицированной по "С" и "T+C" последовательно в ацетилацетон I, ацетилацетон 2 и этанол I, промокая перед каждым перенесением на фильтровальной бумаге.

в) Промойте DE 81 целлюлозу этанолом I и водой последовательно 5 раз и затем водой 5 раз, промокая после каждой промывки на фильтровальной бумаге, и перенесите в этанол 2. Промокните на фильтровальной бумаге и высушите на воздухе.

3. Гидролиз ДНК по местам специфических модификаций

Перенесите кусочки DE 81 целлюлозы в эппендорфские пробирки. Прилейте в каждую пробирку 100 мкл пиперидина и инкубируйте 30 мин при 95°С. Затем отмойте в большом объеме воды (100 мл) и 5 мл этанола, промокая после каждой промывки на фильтровальной бумаге. Высушите на воздухе.

4. Десорбция ДНК с DE 81 целлюлозы

Поместите DE 81 целлюлозу в 50 мкл 2 М NaCl 20 мМ ЭДТА в эппендорфовских пробирках и инкубируйте 20 мин при 70°С. Затем аккуратно перенесите DE 81 целлюлозу в другие пробирки с 50 мкл 2 М NaCl 20 мМ ЭДТА и снова инкубируйте 20 мин при 70°С. Аккуратно удалив DE 81 целлюлозу, объедините содержимое обеих пробирок.

5. Осаждение ДНК

Добавьте в каждую пробирку по 200 мкл этанола, заморозьте в жидком азоте (30 сек) и центрифугируйте 5 мин. Осадок промойте 50 мкл 70% этанола и центрифугируйте 1 мин. Аккуратно удалив супернатант пипеткой, высушите осадки.

Осадки растворите в 2 мкл буфера, содержащего:

80% формамид
50 мМ трис-борат pH 8,3
1 мМ ЭДТА
0,1% ксиленцианол

Электрофорез проводите в 3÷12% полиакриламидном геле (в зависимости от величины фрагмента), содержащем 8 М мочевину, в ТВЕ буфере. Толщина геля 0,2÷0,3 мм. Длина стекол 40÷80 см. Напряжение 1,5÷3 кВ.

Жидкие среды

Среда LB (Luria-Bertani)

На I л:

Бакто-триптон	I0 г
Бакто-дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	I0 г

Доведите pH до 7.5 2 M NaOH.

Среда M9

На I л:

Na_2HPO_4	6 г
KH_2PO_4	3 г
NaCl	0,5 г
NH_4Cl	I г

Доведите pH до 7.5, проавтоклавируйте, охладите и добавьте следующие компоненты:

I M $MgSO_4$	2 мл
20%-ная глюкоза	I0 мл
1 M $CaCl_2$	I мл

Три последних раствора стерилизуйте по отдельности фильтрованием (раствор глюкозы) или автоклавированием.

Среда SM

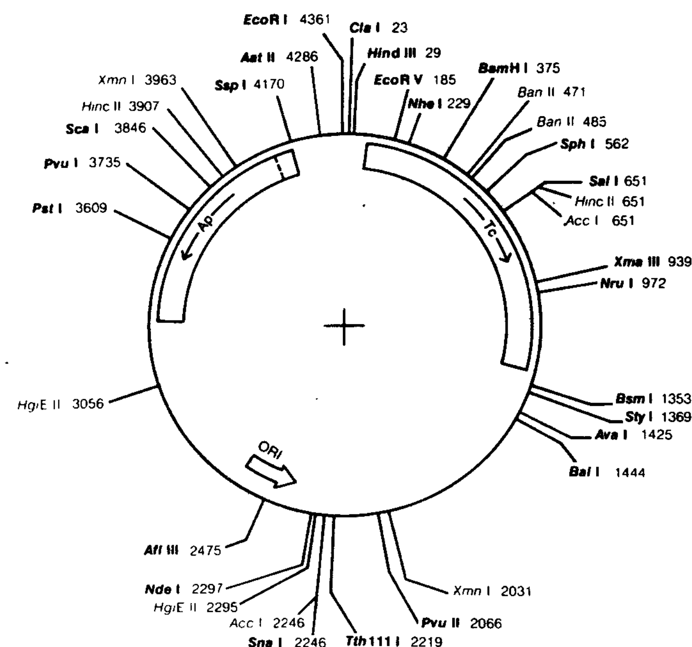
Эту среду используют для хранения и разведения фага.

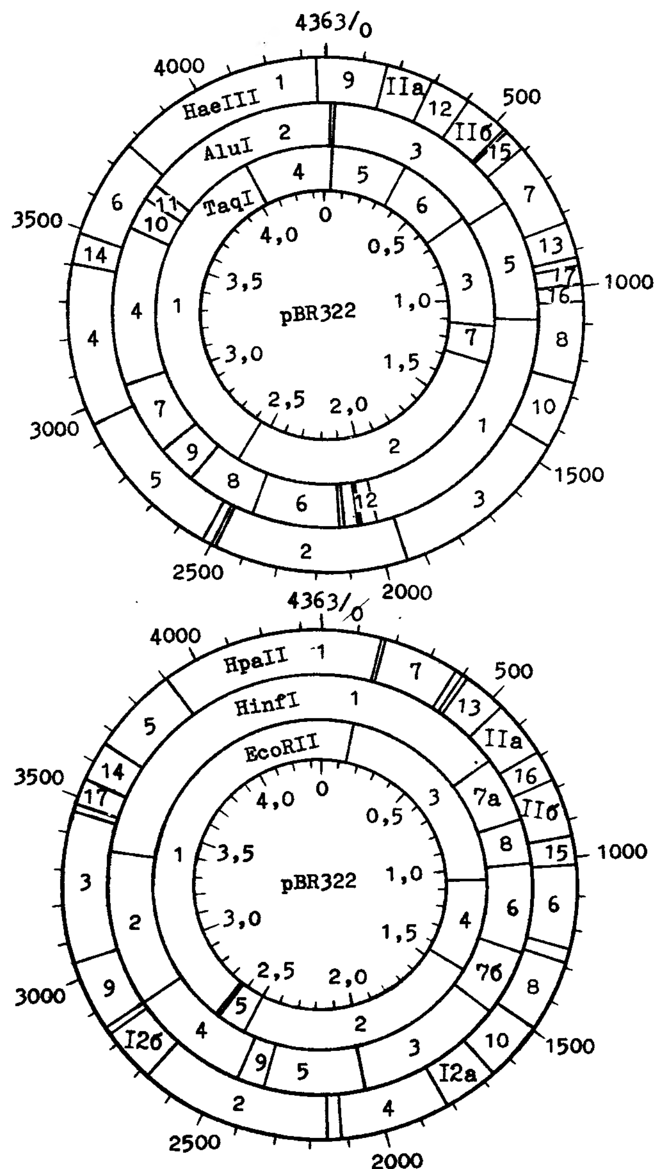
На I л:

NaCl	5,8 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 г
1 M трис-HCl pH 7,5	50 мл
2%-ный желатин	5 мл

Рестрикционная карта ДНК·плазмиды pBR322

Плазмидный вектор для клонирования в E.coli. Кольцевая молекула ДНК длиной 4363 пар оснований. Начало репликации ДНК (ori) из ColE1 производной pMB1. Генетические маркеры: Tc (ген устойчивости к тетрациклину) из pSC101, Ap (ген устойчивости к ампициллину) из транспозона Tn3. Отсчет нуклеотидной последовательности от первой T в уникальном EcoRI-сайте (...GAATTC...) в направлении от Tc к Ap. При определении первичной структуры ДНК pBR322 (Sutcliffe, 1979) была упущена буква C в 526 положении.





Размеры фрагментов рестрикции плазмиды pBR322

Alu I

9I0	I
659	2
655	3
52I	4
403	5
28I	6
257	7
226	8
I36	9
I00	I0
63	II
57	I2
49	I3
I9	I4
I5	I5
II	I6

Hinf I

I63I	I
5I7	2
506	3
396	4
344	5
298	6
22I	7a
220	7б
I54	8
75	9

HaeIII(BspRI)

587	I
540	2
504	3
458	4
434	5
267	6
234	7
2I3	8
I92	9
I84	I0
I24	IIa
I23	IIб
I04	I2
89	I3
80	I4
64	I5
57	I6
5I	I7
2I	I8
I8	I9
II	20
7	2I

Taq I

I444	I
I307	2
475	3
368	4
3I5	5
3I2	6
I4I	7

Hpa II

622	I
527	2
404	3
309	4
242	5
238	6
2I7	7
20I	8
I90	9
I80	I0
I60	IIa
I60	IIб
I47	I2a
I47	I2б
I22	I3
II0	I4
90	I5
76	I6
67	I7
34	I8a
34	I8б
26	I9a
26	I9б
I5	20
9	2Ia
9	2Iб

EcoRII

I857	I
I060	2
928	3
383	4
I2I	5
I3	6

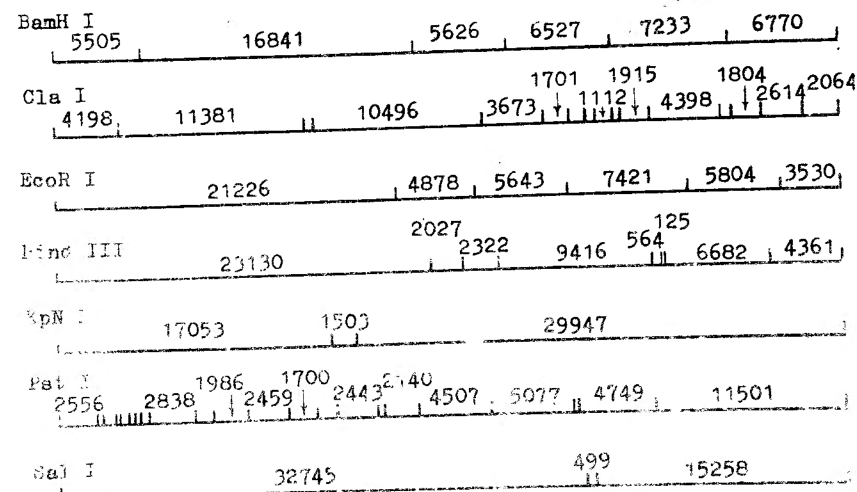
Координаты сайтов рестрикции в pBR322

Уникальные сайты: AvaI (1425), BamH I (375), ClaI (23), EcoRI (4361), EcoRV (185), HindIII(29), PstI (3609), PvuI (3735), PvuII (2066), SalGI (651), XmaIII (939).

2 сайта :	HincII/HindII	(651, 3907)
3 сайта :	BglI	(929, 1163, 3482),
	RsaI	(164, 2282, 3847)
6 сайтов:	EcoRII	(129, 1058, 1441, 2501, 2622, 2635)
7 сайтов:	TaqI	(24, 339, 652, 1127, 1268, 2575, 4019)
8 сайтов:	AvaII	(799, 887, 1136, 1439, 1481, 1760, 3506, 3728)
I0 сайтов:	HinfI	(632, 852, 1008, 1304, 1525, 2031, 2375, 2450, 2846, 3363)
II сайтов:	HaeII	(232, 413, 434, 494, 548, 775, 1205, 1644, 1727, 2349, 2719)
	HgaI	(390, 649, 944, 976, 1240, 1390, 2004, 2181, 2577, 3155, 3905)
I2 сайтов:	FokI	(112, 133, 987, 1032, 1681, 1770, 1848, 2009, 2150, 3348, 3529, 3816)
I6 сайтов:	AluI	(15, 30, 686, 1089, 1999, 2056, 2067, 2116, 2135, 2416, 2642, 2778, 3035, 3556, 3656, 3719)
22 сайта :	MboI/Sau3A	(349, 376, 467, 826, 1098, 1129, 1144, 1461, 1668, 3042, 3117, 3128, 3136, 3214, 3226, 3331, 3672, 3690, 3736, 3994, 4011, 4047)
	HaeIII	(173, 296, 400, 524, 532, 596, 830, 919, 940, 991, 1048, 1261, 1445, 1949, 2489, 2500, 2518, 2952, 3410, 3490, 3757, 4344)
26 сайтов:	HpaII/MspI	(161, 170, 387, 402, 411, 534, 694, 770, 930, 1020, 1258, 1284, 1485, 1665, 1812, 2121, 2155, 2682, 2829, 2855, 3045, 3449, 3483, 3550, 3660, 3902)

Бактериофаг лямбда

Лямбда – бактериофаг E.coli. ДНК λ – линейная молекула с 5'-выступающими липкими концами длиной I2 нуклеотидов. После проникновения в клетку ДНК λ замыкается в кольцо благодаря комплементарному взаимодействию липких концов. Кольцевая молекула состоит из 48502 пар оснований. Отсчет нуклеотидной последовательности начинается с первого основания левого конца GGGCGGCGACCT... и продолжается вдоль L-цепи в направлении от поздних генов к ранним.



Размеры фрагментов рестрикции бактериофага λ

BamH I

I684I I
7233 2
6770 3
6527 4
5626 5
5505 6

Cla I

II38I I
I0496 2
4998 3
4I98 4
3673 5
26I4 6
2064 7
I9I5 8
I804 9
I70I I0
III2 II
973 ......I2
62I I3
537 ......I4
354 ......I5

EcoR I

2I226 I
742I 2
5804 3
5643 4
4878 5
3530 6

Hind III

23I30 I
94I6 2
6682 3
436I 4
2322 5
2027 6
564 7
I25 8

Kpn I

29947 I
I7053 2
I503 3

Sal I

32745 I
I5258 2
499 3

Pst I

II50I I
5077 2
4749 3
4507 4
2838 5
2556 6
2459 7
2443 8
2I40 9
I986 ......I0
I700 II
II59 ......I2
I093 ......I3
805 ......I4
5I4 ......I5
468 ......I6
447 ......I7
339 ......I8
264 ......I9
247 20
2I6 ......2I
2II 22
200 23
I64 24
I50 25
97 26
94 27
72 28

Координаты сайтов рестрикции на ДНК λ

Уникальные сайты рестрикции: ApaI (1086), Nae I (20040), NarI (45679), NheI (34679), SbaBI (12188), XbaI (24508), XhoI (33498).

2 сайта : KpnI (17053, 18556)
SacI (24772, 25877)
SalGI (32745, 33244)
XmaIII (19944, 36654)

3 сайта : PvuI (11933, 26254, 35787)
SmaI (19397, 31617, 39888)

5 сайтов: BamHI (5505, 22346, 27972, 34499, 41732)
EcoRI (21226, 26104, 31747, 39168, 44972)

6 сайтов: BglII (415, 22425, 35711, 38103, 38754, 38814)

7 сайтов: HindIII (23130, 25157, 27479, 36895, 37459, 37584, 44141)

I5 сайтов: ClaI (4198, 15583, 16120, 26616, 30289, 31990, 32963, 33584, 34696, 35050, 36965, 41363, 42020, 43824, 46438)

28 сайтов: PstI (2556, 2820, 3625, 3640, 3856, 4370, 4709, 4909, 5120, 5214, 5682, 8520, 9613, 9777, 11763, 11835, 14294, 14381, 16081, 16231, 17390, 19833, 20281, 22421, 26928, 32005, 32252, 37001)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

I. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М., Мир, 1984.

2. Чувпило С.А., Кравченко В.В. -Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12.

3. Alwine J.C.et al (1979) in Methods in Enzymology, v. 68, pp. 220-242, Academic Press, New York.

4. Clewell D.B., Helinski D.R., Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 1969, v. 62, pp. 1159-1169.

5. Nygaard A.P. and Hall B.D. J.Mol.Biol., 1964, v. 9, pp. 125-142.

6. Southern E.M. J.Mol.Biol., 1975, v. 98, pp. 503-517.

7. Sutcliffe J.G. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 1979, v. 43, p. 77.

8. Maxam A.M., Gilbert W. (1980) in: Methods in Enzymology, v. 65, Part I, pp. 499-550, Academic Press, New York.

Подписано к печати I3/I0-86г. МН II359
Усл.печ.л. 4,I, Уч.изд.л. 3,0, тираж 300. зак. 318.
Формат бумаги 60x84/I6. Бесплатно. 2-й завод

Отпечатано на ротапринте ИЦиГ СО АН СССР, 630090
Новосибирск 90, пр.Академика Лаврентьева,I0